-ane Medical Libra

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München.
(Vorstand: Professor Dr. Broemser.)

Über den Einfluß des gelben Atmungsfermentes auf die Oxydierung von Milchsäure, Laktazidogen und Hexosediphosphorsäure durch Hefedehydrasen.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der

Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Blasius Freitag

aus Arberg

Buchdruckerei Karl Roll, Dreikronenstraße 1
Würzburg 1936

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München.

In Dankbarkeit
meinen lieben Eltern gewidmet!

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153312_0383

Einige grundlegende Begriffe.

Die biologische Oxydation ist kein einfacher Verbrennungsvorgang, sondern ein aus vielen Stufenreaktionen zusammengesetzter chemischer Prozeß.

Die Stoffe, die in der Zelle oxydativ abgebaut werden, sind im wesentlichen nur solche, die durch Abgabe von Wasserstoff, durch Dehydrierung,[1]) die chemischen Veränderungen erfahren. Fermente, welche die Dehydrierung bedingen, heißen Dehydrasen. Sie sind spezifisch auf die Stoffe eingestellt, deren Wasserstoff sie aktivieren.

Der Wasserstoff, der bei der Dehydrierung frei wird, muß von einem Akzeptor gebunden werden. Nach Wieland ist der natürliche Wasserstoffakzeptor Sauerstoff;[2]) dabei entsteht das 1. Reduktionsprodukt der Sauerstoffmolekel, das Wasserstoffperoxyd. Dieses wird durch die Katalase, ein in allen aeroben Lebewesen vorkommendes Ferment, sofort in Wasser und Sauerstoff zerlegt:

$$\begin{matrix} H & O & O-H \\ | & + & \| \\ H & O & O-H \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} H \\ H \end{matrix}\!>\!O + \frac{O_2}{2}.$$

Als Wasserstoffakzeptoren können noch viele andere künstliche Stoffe dienen; häufig wird bei Versuchen Methylenblau dazu benützt. Methylenblau wird dabei zu Leukomethylenblau reduziert:

$$\text{Mbl.} + 2\,H \rightarrow \text{Mbl.} \cdot H_2.$$

In demselben Maß wie bei der Dehydrierung eines Stoffes das Methylenblau zur Leukoverbindung reduziert wird, nimmt es Sauerstoff auf und wird wieder zum Farbstoff oxydiert.[3])

$$\text{Mbl.} \cdot H_2 + \frac{O_2}{2} \rightarrow \text{Mbl.} + H_2O$$

In einem sauerstoffreien System kann daher die Reaktionsgeschwindigkeit der Dehydrierung an der Entfärbungszeit gemessen werden.

Aber der molekulare Sauerstoff verbindet sich oft nicht ohne weiteres mit dem aktivierten Wasserstoff; es ist noch ein „Sauerstoffüberträger" nötig.

Die Oxydationsvorgänge in der Zelle sind heute noch nicht völlig geklärt. Vorliegende Arbeit soll den Einfluß des gelben Atmungsfermentes auf die Oxydierung von Milchsäure,[4]) Laktazidogen und Hexosediphosphorsäure[5]) durch Hefedehydrasen zeigen, soweit die Versuche, die ich darüber machte, es zulassen.

I. Herstellung der einzelnen Substrate.

1. Das gelbe Atmungsferment.

Das gelbe Atmungferment ftellte ich nach den Angaben von Warburg als Lebedewsaft her.[6])

Lebedewsaft: In 2 Glasftutzen von ca. 3 l Inhalt kommen je 1,5 l Wasser. Die feinzerkleinerte Trockenhefe wird unter gutem Verrühren langsam zugesetzt, und zwar in jedem Stutzen 500 gr. Es entfteht eine homogene dickflüssige Emulsion. Zwei Stunden läßt man diese bei 35° ftehen, wobei man immer wieder umrührt. Hernach läßt man auf mehreren großen Filtern dieses Gemisch im Eisschrank über Nacht filtrieren. Aus obigem Ansatz erhält man ca. 1 l Lebedewsaft.

Bleifällung: Zu 1000 ccm frischem Lebedewsaft kommen 400 ccm Liquor Plumbi subacetici (D.A.B. 6) und einige Tropfen Oktanol zur Verhinderung der Schaumbildung; dann wird kräftig geschüttelt. Zur Vervollftändigung der Fällung läßt man 12 Stunden bei 0° ftehen und zentrifugiert hernach scharf ab. Die überftehende Flüssigkeit enthält das Ferment.

Phosphatfällung: Das überschüssige Blei wird mit einem Gemisch von 170 ccm $\frac{m}{2}$ Na_2 HPO_4 und 30 ccm $\frac{m}{2}$ K H_2 PO_4 ausgefällt. Das Bleiphosphat wird abzentrifugiert und die überftehende Lösung auf 0° gebracht.

Azetonfällung: Diese gekühlte Lösung wird mit $^1/_3$ Volumen von eiskaltem Azeton versetzt und bleibt 24 Stunden bei 0° ftehen. Es scheidet sich ein aus Eiweiß beftehender weißer Niederschlag ab, der durch Filtrieren getrennt wird. Das Filtrat wird bei 0° mit CO_2 gesättigt; durch Zusatz von $^1/_2$ Volumen eiskaltem Azeton fällt das Ferment als gelbes Öl aus und setzt sich ab. Die überftehende Flüssigkeit wird dekantiert.

Weitere Reinigung: Das als Bodensatz zurückbleibende Öl wird durch Verreiben in Wasser gelöft. Das nicht in Lösung gehende Eiweiß wird durch scharfes Zentrifugieren abgetrennt. Hernach wieder Sättigung mit CO_2 und Azetonfällung wie vorher.

Dieser Prozeß wird noch zweimal wiederholt, wobei sich das Ferment als immer tiefer gelb werdendes Öl abscheidet und immer weniger Eiweiß ungelöft im Wasser zurückbleibt.

Methanolfällung: Das gelbe Öl wird in 200 ccm Wasser gelöft. Diese Lösung wird bei 0° mit dem gleichen Volumen eisgekühltem Methanol versetzt, wobei alles Ferment ausfällt und sich absetzt. Die überftehende Flüssigkeit wird dekantiert. Das Ferment ift körnig und wird mit absolutem Methanol nachgewaschen. Hernach wird es im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet.

Das so erhaltene gelbe oder rötliche Pulver ift das sogenannte Rohferment.

Dieses Rohferment reinigte ich dann weiter nach dem zweiten Reinigungsverfahren, wie es Warburg und Chriftian angaben.[7])

2 g rohes Fermentpulver werden mit 40 ccm 1 %iger Kochsalzlösung verrieben und nach Zusatz von 0,5 ccm Chloroform und 0,2 ccm Oktanol bei 38° 24 Stunden auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Der weiße Niederschlag wird abzentrifugiert, die überftehende Lösung wird bei 0° in Cellophanschläuchen gegen fließendes deftiliertes Waffer 1—2 Tage dialyfiert und dann im Vakuumexsikkator zur Trockene verdampft.

Der Rückftand, das gereinigte gelbe Ferment, befteht aus durchsichtigen gelben Lamellen, die sich in Waffer zu einer klaren gelben Flüssigkeit lösen.

2. Laktozidogen.

Bei der Herftellung des Laktozidogens aus Muskelkochsaft hielt ich mich an die Angaben von Hahn[8]), wobei ich einmal 20—25 kg Stierfleisch in einem Ansatz verarbeitete.

Zur Herftellung des Kochsaftes werden auf 4 kg Stierfleisch 4,8 l Waffer genommen (bei 20 kg die fünffache Menge). Der von Fett und Faszie befreite Muskel wird gewogen; die entsprechende Menge Waffer zum Sieden erhitzt. Das Fleisch wird in flinker Arbeit portionsweise durch die Fleischmaschine getrieben und jeder Teil sofort in das siedende Waffer unter feftem Umrühren eingetragen. Man vermeidet auf diese Weise, daß das Fleisch nach dem Zerkleinern liegen bleibt, wobei Laktozidogen in Milchsäure übergeführt wird. Durch rasches Einbringen in das siedende Waffer werden die Fermente faft momentan zerftört. Nachdem die letzte Muskelportion zugesetzt ift, kocht man noch 5 Minuten. Es wird abfiltriert und der Reft der Flüssigkeit auf dem Koliertuch scharf abgepreßt. Man erhält so aus 4 kg Fleisch ca. 5000 ccm Saft.

Die Weiterverarbeitung erfolgt nach folgendem Schema:

Muskelkochsaft

↓

Fällung mit Trichloressigsäure

|

Filtrat

↓

Fällung mit Merkuriazetat

|

Filtrat

↓

mit H_2S ertquecksilbert, dann

Fällung mit Bleiessig

|

Niederschlag

↓

zersetzt mit H_2S, Zusatz von $Ba(OH)_2$.

Mit Alkohol-Ausfällung des
Bariumsalzes des Laktazidogens.

1. Fällung mit Trichloressigsäure: Zunächst werden mit Trichloressigsäure Reste von Eiweiß und andere Stoffe ausgefällt. Zu 5000 ccm Kochsaft werden nach Abkühlen 220 gr feste Trichloressigsäure zugesetzt. Man überzeugt sich in einer kleinen abfiltrierten Portion von der Vollständigkeit der Fällung. Nach kurzem Stehen hat sich der Niederschlag gut abgesetzt. Man filtriert durch ein großes Faltenfilter und preßt dann Filter samt Inhalt auf der Nutsche scharf aus. Menge des Filtrates 4500 ccm. In diesem Filtrat ist Laktazidogen enthalten.

2. Fällung mit Merkuriazetat: Nach Neutralisation des Filtrates mit 30%iger Natronlauge gegen Phenolphthalein werden 200 gr festes Merkuriazetat zugesetzt und unter Rühren aufgelöst. Nun erfolgt Zusatz von soviel 30%iger Natronlauge bis die Reaktion gegen Lackmus ganz schwach sauer geworden ist. Es ist eine dicke Fällung entstanden. In einer abfiltrierten Probe überzeugt man sich von ihrer Vollständigkeit. Der Niederschlag wird nach kurzem Stehen auf einer großen Nutsche abgesaugt. Das Laktazidogen ist im Filtrat enthalten.

3. Isolierung des Laktazidogens: Das Filtrat wird mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Vom abgeschiedenen Quecksilber wird abfiltriert und mit 500 ccm Wasser von 50° nachgewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum bis 45° auf 1000 ccm eingeengt.

Nach Neutralisation mit 30%iger Natronlauge wird das Laktazidogen durch Zusatz von 140 ccm Bleiessig (D. A. B. 6) ausgefällt. Der Niederschlag wird nach kurzem Stehen abgesaugt. Nach Zerreiben mit Wasser zu einem dünnen, homogenen Brei wird mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Nach Abfiltrieren des Bleisulfids und Nachwaschen mit Wasser von 50° wird das Gesamtfiltrat im Vakuum bei 45° auf ca. 500 ccm eingeengt.

Durch Zusatz von heißer, gesättigter Barytlösung bis zur Rotfärbung von Phenolphthalein entsteht eine geringfügige Fällung, von der man abfiltriert. Filter samt Inhalt wird auf der Nutsche fest ausgepreßt.

Das Filtrat enthält das Bariumsalz des Laktazidogens. Dieses wird durch Zusatz des doppelten Volumens Alkohol (96%) ausgefällt. Nach Stehen über Nacht im Eisschrank wird der Niederschlag, nach vorherigem Wegsaugen der überstehenden klaren Flüssigkeit, auf einer Nutsche mit gehärtetem Filter abgesaugt und mit 96%igem Alkohol nachgewaschen. Das Bariumsalz wird auf dem Filter im Vakuum über Kalziumchlorid getrocknet.

So erhält man aus 1 kg Fleisch 0,8—1,0 gr Rohsalz.

4. Reinigung des Rohsalzes: Das Rohsalz wird durch Umfällen mit Alkohol gereinigt. Es wird in Wasser (1 g Rohsalz in 25

bis 30 g Wasser) gelöft, was glatt erfolgt. Von der sich nicht lösenden geringen Trübung wird abfiltriert und mit Wasser nachgewaschen. Die Fällung wird im Filtrat durch Zusatz des gleichen Volumens Alkohol (96%) vorgenommen.

5. Identifizierung des Laktazidogens: Die so gewonnene Subftanz wird durch Schmelzpunktbeftimmung und chemische spezifische Reaktionen als das von Embden entdeckte Laktazidogen identifiziert.

Zu den Versuchen benützte ich das reine Bariumsalz. Da es sich herausftellte, daß Barium die Dehydrierung von Laktazidogen ftark hemmt, führte ich es in das Natriumsalz über. Zu seiner Herftellung löfte ich 0,6 gr reines Laktozidogenbarium in 4 ccm Wasser. Durch Zusatz von 1,8 ccm einer gesättigten Lösung von Natriumsulfat (etwa äquivalente Menge) wurde das Barium ausgefällt. Bei kurzem Zentrifugieren setzte sich das Bariumsalz ab. Nachdem ich mich durch Zusatz von ganz wenig Natriumsulfat von der Vollftändigkeit der Fällung überzeugt hatte, goß ich die überftehende klare Flüssigkeit ab und füllte auf 10 ccm auf. Die so erhaltene Lösung von Laktazidogennatrium diente zu meinen Versuchen.

3. Hexosediphosphorsäure.

Das Natriumsalz der Hexosediphosphorsäure bezog ich von der J. G. Farben A.-G. Zu manchen Versuchen reinigte ich das Präparat über das Kalziumsalz. Hierbei ging ich im Anschluß an Neuberg[9]) folgendermaßen vor: Nach Lösen in Wasser setzte ich die äquivalente Menge Kalziumazetat hinzu. Das ausgefallene Kalziumsalz der Hexosediphosphorsäure saugte ich ab und wusch es mit Wasser von 70°. Zu den Versuchen suspendierte ich eine entsprechende Menge Kalziumsalz in Wasser und schüttelte es mit nicht ganz der äquivalenten Menge Dinatriumoxalat eine Stunde lang. Das Filtrat, das frei von Oxalationen war, gebrauchte ich zu den Versuchen.

4. Hefedehydrasen.

Als Dehydrasenpräparat verwendete ich ein Fermentpulver, das ich nach den Angaben von Müller[10]) durch Fällung von Lebedewsaft mit einem Alkohol-Äther-Gemisch herftellte. Zum Auswaschen des Nutschenrückftandes benutzte ich sofort absoluten Äther und ließ den von Müller benutzten absoluten Alkohol weg.

Zu beftimmten Versuchen reinigte ich das Ferment durch Umfällen. Ich verrieb das Trockenpulver mit der siebenfachen Menge Wasser und filtrierte über Nacht bei 0°. Das Filtrat fällte ich wieder mit Alkohol-Äther-Gemisch und ließ nach einftündigem Stehen auf der Nutsche absaugen. Zuweilen hatte das umgefällte Produkt etwas klebrige Beschaffenheit. Unter diesen Umftänden verrieb ich es mit absolutem Äther und sog nochmals ab. Dann war das Pulver trocken und rein weiß. Diese Umfällung nahm ich manchmal zweimal vor. Für die Versuche mit Laktazidogen und Hexosediphosphorsäure fällte ich das Präparat immer noch einmal um.

Dieses Präparat enthält verschiedene Dehydrasen; die Milchsäure-Dehydrase ist sehr wirksam und lange haltbar, die Laktazidogen-Dehydrase kann man noch als gut bezeichnen, während die Hexosediphosphorsäure-Dehydrase nur schwach wirkt.

Durch das Umfällen werden unter anderem Verunreinigungen entfernt, die Wasserstoff-Donatoren sind, d. h. Stoffe, die dadurch, daß sie dehydriert werden, Methylenblau entfärben. An Versuchen mit umgefälltem Ferment tritt daher ohne Zusatz von Milchsäure, Laktazidogen oder Hexosediphosphorsäure erst nach vielen Stunden Entfärbung von Methylenblau ein. Die „Restreduktion" fehlt praktisch.

5. Gewaschene Hefe.

Zum Auswaschen verrührte ich 50 g Trockenhefe in 1 Liter Wasser und ließ 20 Minuten in der Schüttelmaschine gut schütteln. Hernach zentrifugierte ich die Hefe stark ab, verrührte sie wieder mit Wasser zu einem homogenen Brei und ließ abermals 20 Minuten schütteln usw. Im ganzen nahm ich zehnmal in dieser Weise die Waschung vor.

II. Versuche mit den angegebenen Stoffen.

1. Bereits bekannte Tatsachen.

In den Hefeextrakten, wie sie Hahn und Mitarbeiter herstellten,[11]) sowie in den Lösungen des reinen Fermentes[12]) findet im Vakuum bei Gegenwart von Methylenblau Dehydrierung von Milchsäure statt, wie man dies aus der Abnahme der Milchsäure und der Bildung von Brenztraubensäure erkennen kann.

Trotz dem Gehalt der Lösungen an Milchsäuredehydrase bekommt man mit Sauerstoff keine Abnahme der Milchsäure.[13]) Sauerstoff ist für diese Systeme ein indifferentes Gas. Bei Durchsicht der Literatur findet man, daß schon frühere Autoren[14]) Fälle beschrieben haben, wo trotz dem Vorhandensein von spezifischen Dehydrasen mit Sauerstoff kein Abbau der entsprechenden Substrate eintritt. Hahn und Mitarbeiter haben aus ihren Versuchen geschlossen, daß zum Abbau der Milchsäure mit Sauerstoff außer der Milchsäuredehydrase aus Hefe noch ein weiterer Stoff notwendig ist, den sie als Sauerstoffüberträger bezeichnet haben.[15]) Daß es sich hierbei nur um eine vorläufige Benennung handelt, haben sie ausdrücklich betont.

Weitere Untersuchungen[16]) haben ergeben, daß Abbau der Milchsäure in der lebenden Hefe auch mit Sauerstoff erfolgt, wie dies auch von Wieland und Mitarbeitern[17]) gefunden wurde. Dieser Abbau mit Sauerstoff wird durch Zusatz von Cyanid vollständig aufgehoben. Es handelt sich hierbei um einen Vorgang an der intakten Zelloberfläche, wie solche Prozesse von Warburg untersucht worden sind.

Auch die nach Lebedew hergeſtellte Trockenhefe[18]) zeigt Abbau der Milchsäure durch Sauerſtoff. Zusatz von Cyanid vermag diesen Vorgang nicht vollſtändig aufzuheben. Bei Gegenwart dieses Giftes bleibt noch ungefähr $^1/_4$ des urſprünglichen Milchsäureabbaus übrig. Dieser Reſt iſt offenbar ein Vorgang, der nicht an die Oberfläche der Zelle gebunden iſt.

Im zellfreien Lebedewsaft, der eine ſtarke Milchsäuredehydrase enthält, bekommt man mit Sauerſtoff eine Abnahme der Milchsäure, die zwar kleiner iſt als bei lebendiger Hefe und Trokkenhefe, deren Vorkommen aber in zahlreichen Hefe-Mazerationsſäften sicher nachgewiesen wurde. Dieser Abbau der Milchsäure iſt vollkommen resiſtent gegen Cyanid.

Somit kann man die Annahme machen, daß der Hefemazerationssaft neben der Milchsäuredehydrase einen Sauerſtoffüberträger enthält, durch dessen Vermittlung die Abnahme der Milchsäure mit Sauerſtoff erfolgt.

Von dem Abbau der Milchsäure mit Sauerſtoff in Hefe kann man sich somit folgende Vorſtellung bilden. In der lebenden Hefe mit ihrer intakten Zelloberfläche vollzieht sich ein sehr ſtarker Abbau der Milchsäure entsprechend der sehr ſtarken Atmung der lebenden Hefe. Dieser cyanidempfindliche Vorgang überwiegt an Umfang so, daß daneben die cyanidresiſtente Atmung bei den Versuchen mit lebender Hefe nicht nachweisbar war. Bei der Trokkenhefe iſt die Oberflächenſtruktur der Zellen schon verändert. Die Atmung iſt wesentlich geringer als bei frischer Hefe (auf die gleiche Menge Trockensubſtanz berechnet). Es tritt deutlich die cyanidresiſtente, nicht an die Zelloberfläche gebundene Atmung in Erscheinung. Im zellfreien Lebedewsaft[19]) findet der Abbau der Milchsäure mit Sauerſtoff nur noch in ganz geringem Umfang ſtatt. Dieser Vorgang iſt vollkommen unempfindlich gegen Cyanid.

Bei der Prüfung, ob bei Benutzung der Fermentpräparate nach Müller mit Sauerſtoff die Milchsäure abnimmt, zeigte sich, daß sich die einzelnen Präparate verschieden verhalten. Manchmal bekommt man schon bei der erſten Fällung eine Dehydrase, in deren Lösung der Sauerſtoff nicht wirkt, während mit Methylenblau eine ſtarke Abnahme der Milchsäure zu beobachten iſt, d. h. ein Präparat, in dem der Sauerſtoffüberträger fehlt. Häufiger iſt es so, daß die Lösungen aus nicht umgefälltem Fermentpulver noch eine geringe, aber sicher nachweisbare Abnahme der Milchsäure mit Sauerſtoff zeigen, d. h., daß der Sauerſtoffüberträger noch in geringerer Menge vorhanden iſt. Durch zweimaliges Umfällen kann man manchmal den Sauerſtoffüberträger vollkommen entfernen, zuweilen bleibt aber auch dann noch ein kleiner Reſt zurück.

Vor einiger Zeit hat Warburg[20]) aus Lebedewsaft einen Stoff isoliert, den er als gelbes Atmungsferment bezeichnet. Nach Warburgs Untersuchungen spielt dieses Ferment die Rolle eines

Sauerstoffüberträgers beim fermentativen Abbau des Robison-Esters, einer Hexosemonophosphorsäure. Der Vorgang ist resistent gegen Cyanid. Auch schreibt ihm Warburg bei der fermentativen Dehydrierung des Esters mit Methylenblau entscheidende Bedeutung zu.

Es fragt sich, wie weit das gelbe Atmungsferment auch bei anderen Substraten als Übertragungskatalysator bei der zellfreien Oxydation in Frage kommt. Hier liegen Untersuchungen verschiedener Autoren vor.

Green und Dixon[21]) zeigten, daß bei der Oxydation von Hypoxanthin mit Sauerstoff unter dem Einfluß der entsprechenden Dehydrase das gelbe Atmungsferment nicht beteiligt ist. Bertho und v. Zychlinski[22]) sprechen für die Substrate Glukose, Methylalkohol, Milchsäure, Brenztraubensäure und Methylglyoxal dem gelben Atmungsferment die Rolle eines Sauerstoffüberträgers ab. Euler und Adler[23]) kommen zum Schluß, daß sowohl für Äthylalkohol, als auch Robison-Ester bei Methylenblau- und Sauerstoffdehydrierung das gelbe Atmungsferment notwendig sei. Wagner-Jauregg, Rauen und Möller[24]) haben gezeigt, daß die Entfärbungszeit von Methylenblau bei der Dehydrierung von Äpfelsäure durch eine aus Muskel gewonnene Dehydrase durch Zusatz des gelben Atmungsfermentes stark verkürzt wird. Dagegen scheint bei der Dehydrierung der Äpfelsäure durch Sauerstoff das gelbe Atmungsferment keinen Einfluß zu haben.

2. Über den Einfluß des gelben Atmungsfermentes auf die Dehydrierung von Milchsäure.

Man beobachtet nicht selten Lebedew-Säfte, die eine starke Milchsäuredehydrase enthalten, in denen aber durch Sauerstoff keine Abnahme der Milchsäure eintritt. Man findet aber in den aus Löwenbräu-Hefe hergestellten Mazerations-Säften niemals solche, die kein gelbes Atmungsferment enthalten. Diese Beobachtung spricht eigentlich in dem Sinn, daß der Sauerstoffüberträger bei dem Abbau der Milchsäure in Lebedew-Saft nicht das gelbe Atmungsferment ist. Meine Versuche bewiesen dies auch.

Einige Versuche stellte ich mit Rohferment, die meisten Versuche mit gereinigtem Ferment an. Die Zusammensetzung der einzelnen Ansätze war folgende:

15 ccm Dehydraselösung (10 g Fermentpulver in 70 ccm Phosphatpuffer [pH = 7] gelöst),
15 ccm Wasser, ev. enthaltend 1 g gelbes Ferment,
5 ccm Aaktatlösung (1%).

Von zwei Parallelansätzen wurde der eine sofort, der andere nach dreistündiger Digestion mit Sauerstoff bei 35° mit Sublimat-Salzsäure enteiweißt. Dann erfolgte die Bestimmung der Milchsäure.[25])

Die Versuche mit Rohferment enthält Tab. 1.

Tabelle 1.
(mg Milchsäure)

Nr.	1	2
Direkt	40,1	50,3
Digeriert	40,0	50,1

Ich hatte hier ein Dehydrase-Präparat zur Verfügung, das frei von Sauerſtoffüberträger war. Auch bei Gegenwart von gelbem Atmungsferment findet nicht die geringſte Abnahme der Milchsäure mit Sauerſtoff ſtatt.

Die Versuche mit gereinigtem Ferment findet man in Tab. 2.

Tabelle 2.
(mg Milchsäure)

	1		2		3		4	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Direkt	50,0	52,7	48,5	49,0	45,8	46,9	44,0	44,7
Digeriert	43,2	45,7	46,0	42,7	41,4	44,0	43,8	44,5
Abnahme	7,8	7,0	2,5	6,3	4,4	2,9	0,2	0,2

Ich ſtellte sie mit vier verschiedenen Dehydrase-Präparaten an. Jedem der Versuche 1—4 entspricht ein anderes Präparat. Auch machte ich ſtets einen Versuch mit Sauerſtoff ohne Zusatz von gelbem Ferment (in Tab. 2 mit A bezeichnet), und einen Parallelversuch mit Zusatz von gelbem Ferment (in Tab. 2 mit B bezeichnet).

Dehydrase-Präparat 1 war nicht umgefällt worden. Es enthält noch Sauerſtoffüberträger. Man findet mit und ohne Zusatz von gelbem Ferment die gleiche Milchsäureabnahme mit Sauerſtoff.

Die Präparate 2—4 waren zweimal umgefällt worden. Es enthielten trotzdem 2 uad 3 noch etwas Sauerſtoffüberträger. Man beobachtet auch hier bei Zusatz von gelbem Ferment keine vermehrte Milchsäureabnahme mit Sauerſtoff. (Die Abnahme iſt bei 2 im Versuch mit gelbem Ferment ein wenig größer, bei 3 in beiden Versuchen innerhalb der Fehlergrenze gleich).

Präparat 4 war frei von Sauerſtoffüberträger. Auch bei Zusatz von gelbem Ferment findet keine Abnahme der Milchsäure mit Sauerſtoff ſtatt. Die Wirksamkeit der Milchsäuredehydrase wurde in diesem Präparat durch dreiſtündige Digeſtion bei 35° mit Methylenblau feſtgeſtellt. Hierbei ergab sich in einem, dem Sauerſtoffverbrauch analog zusammengesetzten Ansatz eine Abnahme der Milchsäure von 22 mg.

Aus den Versuchen der Tab. 1 u. 2 muß man schließen, daß das gelbe Atmungsferment in Milchsäuredehydraselösungen aus Hefe nicht als Sauerſtoffüberträger wirkt.

Diese Tatsache wurde ein halbes Jahr nach Veröffentlichung der Arbeit auch durch Adler und Michaelis bestätigt.[26])

In weiteren Versuchen wurde festgestellt, wie die Entfärbungszeit von Methylenblau in einem System, enthaltend Milchsäuredehydrase und Milchsäure, durch Zusatz von gelbem Atmungsferment beeinflußt wird.

Die Zusammensetzung der Ansätze war folgende:

0,3 ccm Dehydraselösung,
1,0 ccm Wasser, event. mit 200 mg gelbem Ferment,
1,0 ccm Laktatlösung (2%),
1,0 ccm Methylenblau (1 : 1000) in Phosphatpuffer (m/15; pH = 7).

Die Temperatur betrug 37°. Die Resultate enthält Tab. 3.

Tabelle 3.
(Entfärbungszeit in Min.)

	Nr.	Mit reinem gelbem Ferment						Mit Rohferment	
		1*	2	3	4*	5	6*	5a	6a*
Ohne	gelbem	19,0	17,5	16,0	30,5	29,0	26,0	25,0	25,0
Mit	Ferment	19,0	16,0	15,0	31,5	28,5	22,0	21,5	19,0

In den mit * versehenen Versuchen war die Milchsäuredehydrase durch zweimaliges Umfällen gereinigt worden. Man sieht, daß durch Zusatz von reinem gelben Atmungsferment nur eine geringfügige Verkürzung der Entfärbungszeit eintritt. Etwas stärker, zum mindesten nicht geringer, ist die Verkürzung der Entfärbungszeit bei Zusatz von Rohferment. (Versuch 5 u. 5a; bezw. 6 u. 6a können direkt miteinander verglichen werden, da sie mit demselben Dehydrase-Präparat angestellt worden sind.)

Die Resultate sprechen gegen eine Beteiligung des gelben Atmungsfermentes an der anaeroben Dehydrierung der Milchsäure mit Methylenblau. Auch wenn man berücksichtigt, daß nach Euler das aus Lebedew-Saft hergestellte Dehydrase-Präparat schon etwas gelbes Ferment enthält, so müßte doch der Zusatz einer so großen Menge reinen Fermentes die Entfärbungszeit wesentlich beeinflussen. Nach den von Euler[27]) angegebenen Zahlen enthält der Versuch ohne Zusatz des gelben Ferments höchstens $^1/_2$ der Farbstoffkomponente des Fermentes, nach Zusatz aber mindestens 40. In der Tat hat ja auch Euler bei den von ihm untersuchten Systemen schon bei wesentlich geringerem Zusatz von gelbem Ferment eine starke Verkürzung der Entfärbungszeit des Methylenblaus gefunden.

Im gleichen Sinn spricht die Tatsache, daß das Rohferment, das nur einen Bruchteil der Farbstoffkomponente des reinen Fermentes enthält, die Entfärbungszeit eher noch etwas stärker, sicher nicht weniger verkürzt als das gereinigte Ferment. Die geringfügige Verkürzung der Entfärbungszeit durch das gelbe Ferment ist wohl

*) Versuche mit umgefällten Dehydrasepräparaten.

gar nicht durch das Ferment selber bedingt, sondern durch gleichzeitig vorhandene Verunreinigungen, die Wasserstoff-Donatoren sind und dadurch zur Verkürzung der Entfärbungszeit des Methylenblaus führen. Diese sind in größerer Menge im Rohferment als im gereinigten Ferment vorhanden. Daher hat das erstere keinen kleineren Einfluß auf die Entfärbungszeit als das gereinigte Ferment, obwohl der eigentliche Fermentgehalt viel geringer ist.

Zu demselben Resultat kommt man auf Grund von Versuchen, die mit Milchsäuredehydrase und gelbem Ferment allein, d. h. ohne Zusatz von Milchsäure angestellt wurden.

Ihre Zusammensetzeng war folgende:

0,3 ccm Dehydraselösung,

1,0 ccm Wasser, darin event. 200 mg gelbes Ferment, 6 Tropfen Methylenblau (1 : 1000) in Phosphatpuffer (m/15; pH = 7).

Die Konzentration des Methylenblaus wurde sehr gering gewählt, weil der Gehalt des gelben Atmungsfermentes an Wasserstoff-Donatoren offenbar gering ist. Das verwendete Dehydrase-Präparat war zweimal umgefällt worden.

Man erkennt aus Tabelle 4 die starke Verkürzung der Entfärburgszeit von Methylenblau durch das gelbe Atmungsferment.

Tabelle 4.

(Entfärbungszeit in Min.)

	Mit reinem, gelbem Ferment	Mit Rohferment
Ohne	22,0	22,0
Mit	5,5	5,5

Die wahrscheinlichste Annahme zur Erklärung ist die Gegenwart von Donatoren im gelben Ferment. So erklärt es sich auch zwanglos, daß mit Rohferment die gleiche Verkürzung der Entfärbungszeit zu beobachten ist, wie mit gereinigtem Ferment, obwohl das Rohferment viel weniger von der charakteristischen Farbstoffkomponente enthält als das gereinigte Ferment. Man könnte natürlich auch daran denken, daß durch den Zusatz von gelbem Ferment die „Reftreduktion" stark beschleunigt würde. Dann sprechen aber die Versuche der Tab. 3 erst recht gegen eine Beteiligung des gelben Atmungsfermentes an der anaeroben Dehydrierung der Milchsäure mit Methylenblau.

Wie früher erwähnt, enthält Trockenhefe eine starke Milchsäuredehydrase. Auch Sauerstoff bewirkt in diesem System eine Abnahme der Milchsäure. Da ein Teil dieses Vorgangs cyanidempfindlich, ein anderer cyanidresistent ist, sind bei ihm wohl mindestens zwei Sauerstoffüberträger beteiligt. Durch sehr häufiges Auswaschen mit Wasser kann man, bei Erhaltung der Milchsäure-Dehydrase, die Sauerstoffüberträger sehr weitgehend entfernen. Daß die Milchsäure-Dehydrase nach Auswaschen noch vorhanden ist, ergeben entsprechende Versuche, die eine Abnahme der Milchsäure

mit Methylenblau zeigen. Es ist mir nur einmal gelungen, die Sauerstoffüberträger vollständig zu entfernen. Nach sehr häufigem Auswaschen bleibt meist noch ein kleiner Rest von Sauerstoffüberträgern zurück.

Die Zusammensetzung der Ansätze war folgende:

5 g gewaschene Hefe,
15 ccm Wasser, ev. mit 1 g gelbem Ferment,
10 ccm Laktatlösung in Phosphatpuffer (m/15; pH = 7), enthaltend 100 mg Lithiumlaktat.

Tab. 5 zeigt das Resultat der Versuche.

Tabelle 5.
(mg Milchsäure.)

	Ohne gelbes Ferment			Mit gelb. Ferment		
	Direkt	Digeriert	Abn.d. Milchs.	Direkt	Digeriert	Abn.d. Milchs.
1	81,4	81,2	0,2	—	—	—
2	86,3	82,0	4,3	86,2	81,8	4,4
3	95,2	89,8	5,4	95,8	87,8	8,0

In Nr. 1 waren bei gut erhaltener Dehydrase die Sauerstoffüberträger vollkommen entfernt. Leider wurde hier ein Versuch mit gelbem Atmungsferment nicht gemacht. In 2 und 3 gelang die Auswaschung der Sauerstoffüberträger nicht vollständig. In Versuchen ohne gelbes Ferment nahm die Milchsäure mit Sauerstoff um 4,3 mg bezw. 5,4 mg ab, also um einen sehr kleinen Betrag verglichen mit der Sauerstoffabnahme der Milchsäure in ungewaschener Trockenhefe.[28]) Mit Zusatz von gereinigtem gelben Ferment waren die Abnahmen 4,4 mg bezw. 8,0 mg.

Einen nachweisbaren Einfluß übt somit das gelbe Atmungsferment auch bei Trockenhefe auf die Abnahme der Milchsäure mit Sauerstoff nicht aus.

3. Über den Einfluß des gelben Atmungsfermentes auf die Dehydrierung von Laktazidogen und Hexosediphorsäure.

Auf Grund der Versuche von Warburg war daran zu denken, daß das gelbe Ferment vielleicht allgemein beim Abbau der Kohlehydrat-Phosphorsäure-Ester eine Rolle spiele. Zur Prüfung dieser Frage benutzte ich Laktazidogen und Hexosediphosphorsäure.

A. Versuche mit Laktazidogen.

1. Versuche mit Methylenblau.

Zunächst prüfte ich, wie Zusatz von gelbem Ferment die Dehydrierung des Laktazidogens mit Methylenblau beeinflußt.

Zur Herstellung der Dehydraselösung verrieb ich 2 g Fermentpulver in 14 ccm Wasser. Durch Filtration erhielt ich eine klare,

leicht gelblich gefärbte Lösung. Ich machte die Versuche mit vier verschiedenen Dehydrasepräparaten, die im folgenden mit I. bis IV. bezeichnet sind.

Vom gelben Ferment brachte ich 1 g durch Verreiben mit 5 ccm Wasser in Lösung. Die stark gelb gefärbte Flüssigkeit zeigte eine leichte Trübung durch ausgefallenes Eiweiß.

Als Methylenblaulösung diente eine 1,25%ige Lösung dieses Farbstoffes in Phosphatpuffer (m/15; pH = 7).

Die Zusammensetzung der Ansätze war folgende:

0,3 ccm Dehydraselösung,
1,0 ccm Lösung von gelbem Ferment, bezw. Wasser,
1,0 ccm Laktazidogenlösung,
10 Tropfen Methylenblaulösung.

Hierin ist die Laktazidogenmenge äquivalent der Milchsäuremenge der früheren Versuche. Die Beobachtung erfolgte in evakuierten und zugeschmolzenen Reagensgläsern,[28]) bei 37°.

Das Resultat der Versuche enthält Tab. 6. Man erkennt, daß die Entfärbungszeit des Methylenblaus durch gelbes Ferment im allgemeinen auf etwa ein Drittel herabgesetzt wird. Es verhalten sich hierbei die verschiedenen Fermentpräparate gleich. Mit denselben Fermentlösungen habe ich in Versuchen, die die äquivalente Menge Lithiumlaktat enthielten, nochmals den Einfluß des gelben Fermentes auf die Entfärbungszeit bei der Dehydrierung von Milchsäure untersucht.

Tabelle 6.

(Entfärbungszeit in Min.)

A: ohne gelbes Atmungsferment; B: mit gelbem Atmungsferment.

Laktazidogen			Hexosediphosphors.			Milchsäure		
A	B	Ferm.-Präp.	A	B	Ferm.-Präp.	A	B	Ferm.-Präp.
14	4	I	50	15	I	11	10,5	I
14	8,5	I	46	16	II	25	22	II
15,5	4,5	I	33	9,5	II	11,5	10,5	III
7,5	1,7	II	35	15	II	9	10	IV
16	5,5	II	40	14	III			
11	4	III	38	20	III			
12	4	IV	41	14	IV			
			53	26	IV			

Tab. 6 zeigt den charakteristischen Unterschied.

Während die Entfärbungszeit des Methylenblaus bei Gegenwart von Laktazidogen auf etwa ein Drittel herabgesetzt wird, wird die Entfärbungszeit bei Gegenwart von Milchsäure praktisch nicht beeinflußt. Mit dem gleichen Fermentmaterial zeigen somit beide Systeme ganz verschiedenes Verhalten.

2. Atmungsversuche mit Sauerstoff.

Die Atmungsversuche mit Sauerstoff machte ich mit Bacroftmanometern, die mit Brodiescher Lösung gefüllt waren.[30]) Die Temperatur variierte bei den verschiedenen Versuchen zwischen 19° und 22°. Die Ablesung erfolgte alle 15 Minuten. Der Sauerstoffverbrauch ist auf Normalbedingungen des Drucks und der Temperatur umgerechnet und in cmm angegeben.

Da für Atmungsversuche die Gegenwart von Phosphatpuffer von Vorteil ist, wurde die Dehydraselösung hergestellt durch Verreiben von 1 g Fermentpulver in 2 ccm Wasser, Zusatz von 5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; pH = 7) und Filtration der Lösung. Die Lösungen des gelben Fermentes und des Laktozidogens waren dieselben wie bei den Entfärbungsversuchen.

Die Atmungsgefäße enthielten:

0,3 ccm Dehydraselösung,
0,7 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; pH = 7),
1,0 ccm Laktazidogenlösung,
1,0 ccm Lösung des gelben Fermentes, bezw. Wasser.

Die Resultate mit den verschiedenen Dehydrase-Präparaten enthält Tabelle 7.

Tabelle 7.

(Sauerstoffverbr. in ccm)

A: ohne gelbes Atmungsferment; B: mit gelbem Atmungsferment.

Nr.	Fermentpräparat	Versuchsdauer (Min.)	A	B
1	II	70	44,5	131,7
2	II	100	27,9	79,0
3	III	120	68,2	158,0
4	IV	60	37,4	92,0

Man erkennt, daß der Zusatz von gelbem Atmungsferment die Sauerstoffaufnahme um mehr als aufs Doppelte erhöht.

Es zeigte sich, daß der Zusatz von gelbem Ferment zur Dehydraselösung allein, d. h. ohne Laktazidogen, schon eine Vermehrung der Sauerstoffaufnahme in wechselndem Umfang erzeugt. Diese Tatsache muß bei den obigen Versuchen berücksichtigt werden.

Die durch Zusatz von gelbem Ferment zur Dehydraselösung erzeugte Atmungssteigerung wurde in Kontrollversuchen bei den verschiedenen Dehydrasepräparaten untersucht. Die Zusammensetzung der Ansätze war folgende:

0,3 ccm Dehydraselösung,
0,7 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; pH = 7),
1,0 ccm Lösung des gelben Fermentes bezw. Wasser,
1,0 ccm Wasser.

So wurde festgestellt, wieviel Sauerstoff in Versuchen, die Dehydrase und gelbes Ferment enthielten, mehr verbraucht wurde als

in Versuchen, die nur Dehydrase enthielten. Auch letztere zeigen eine, allerdings geringfügige, Sauerſtoffaufnahme. Nach 1 bis 2 Stunden 15 bis 30 ccm.)

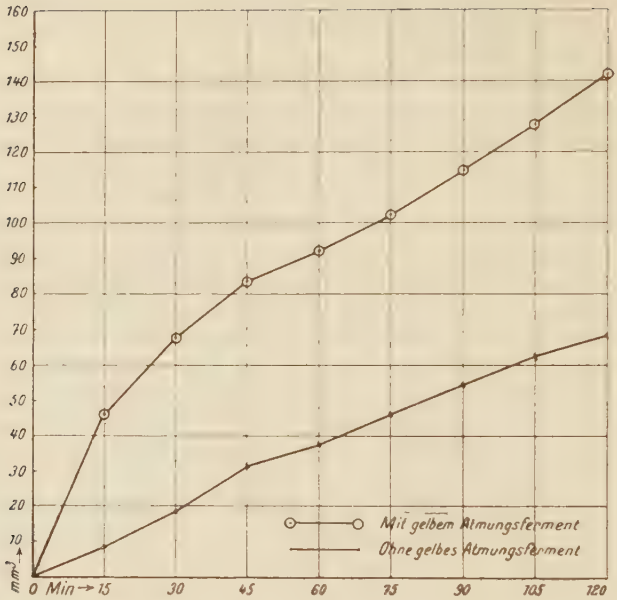
Bei Dehydraſepräparat II fand ich nach etwa 2 Stunden einen Mehrverbrauch von Sauerſtoff in den Ansätzen mit gelbem Ferment von 3,3 bezw. 4,6 cmm in 2 verſchiedenen Versuchen. Dieser Mehrverbrauch iſt so gering, daß eine Korrektur der Werte von den Versuchen 1 und 2 der Tab. 2 nicht in Frage kommt. Auch ergab sich dies für Vers. 2 aus der Tatsache, daß in einem Parallelversuch, der Dehydrase und gelbes Ferment ohne Laktazidogen enthielt, ein Sauerſtoffverbrauch von 16 ccm beobachtet wurde. Hieraus geht hervor, daß der durch Zusatz von gelbem Ferment zur Dehydrase erzeugte Sauerſtoffmehrverbrauch sehr klein sein muß, da ohne gelbes Ferment die Dehydrase allein meiſt schon einen höheren Sauerſtoffverbrauch als 16 ccm zeigt. Die Werte von Vers. 1 und 2 der Tab. 7 bedürfen somit keiner weiteren Korrektur.

Mit Dehydraſepräparat III erhielt ich in 2 Versuchen mit gelbem Ferment 21 bezw. 4 cmm mehr Sauerſtoffverbrauch als in Versuchen mit Dehydrase allein. Man sieht, daß die Werte ſtark wechseln. Nimmt man die Korrektur mit dem größten der beiden Werte vor, d. h. subtrahiert man von 258 bei Vers. 3 Tab. 7 den Wert 20, so bedeutet der erhaltene Wert 138 cmm immer noch eine Steigerung der Atmung durch gelbes Ferment aufs Doppelte.

Mit Dehydraſepräparat IV fand ich eine Steigerung des Sauerſtoffverbrauchs durch gelbes Ferment allein von 25 cmm. Subtrahiert man diesen Wert von 92 des Vers. 4 Tab. 7, so bleibt mit 67 cmm immer noch eine Steigerung des Sauerſtoffverbrauchs auf das Doppelte.

Somit ergibt sich, daß der Sauerſtoffverbrauch beim Abbau von Laktazidogen durch Zusatz von gelbem Atmungsferment etwa auf das Doppelte geſteigert wird.

Die nachfolgende Abbildung zeigt graphisch in Ablesungen, die alle 15 Minuten erfolgten, den Sauerſtoffverbrauch in Versuchen mit und ohne Zusatz von gelbem Ferment. Man sieht, daß die Sauerſtoffaufnahme ohne gelbes Ferment linear mit der Zeit verläuft. Die ſtarke Steigerung durch Zusatz von gelbem Ferment macht sich vor allem in einem ſteilen Anſtieg der Kurve in der erſten Hälfte der Versuchszeit geltend.



B. Versuche mit Hexosediphosphorsäure.

Es ergab sich kein Unterschied in den Versuchsresultaten mit Rohprodukt und reinem Natriumsalz der Hexosediphosphorsäure. Der Gehalt an hexosediphosphorsaurem Natrium betrug in den verwendeten Lösungen 0,4 g in 5 ccm Wasser und war äquivalent den Milchsäure- und Laktatmengen in den entsprechenden früheren Versuchen.

1. Versuche mit Methylenblau.

Die Zusammensetzung der Ansätze war:

0,3 ccm Dehydraselösung,
1,0 ccm Lösung des gelben Fermentes bezw. Wasser,
1,0 ccm Lösung von Hexosediphosphat,
5 Tropfen Methylenblau.

Von der Methylenblaulösung wurde somit die Hälfte, wie in den Versuchen mit Laktazidogen genommen. Trotzdem war die Entfärbungszeit des Methylenblaus etwa das Vierfache wie bei Laktazidogen. Man sieht hieraus, daß die Fermentpräparate nur wenig Dehydrase für Hexosediphosphorsäure enthalten.

Aus Tabelle 6 kann man entnehmen, daß auch bei der Dehydrierung der Hexosediphosphorsäure durch Zusatz von gelbem Ferment die Entfärbungszeit des Methylenblaus auf etwa ein Drittel der Entfärbungszeit ohne gelbes Ferment herabgesetzt wird.

2. Atmungsversuche mit Sauerstoff.

Die Methylenblauversuche hatten schon gezeigt, daß der Gehalt der Fermentpräparate an Dehydrase, die auf Hexosediphosphorsäure eingestellt ist, sehr gering ist. Die Atmungsversuche ergaben keine Atmungssteigerung durch Hexosediphosphorsäure. Auch der Unterschied im Sauerstoffverbrauch mit und ohne Zusatz von gelbem Ferment entspricht nur der durch gelbes Ferment allein bedingten Atmungssteigerung. Es kann daher durch meine Versuche die Frage zunächst nicht gelöst werden, ob das gelbe Ferment die Sauerstoffaufnahme beim Abbau der Hexosediphosphorsäure beeinflußt.

Zusammenfassung.

Meine Versuche mit Hefedehydrasen und gelbem Atmungsferment hatten folgendes Ergebnis:

1. *Die Entfärbungszeit des Methylenblaus* wird durch das gelbe Atmungsferment bei der *Milchsäuredehydrierung nicht* beeinflußt, während sie bei der Dehydrierung von Laktazidogen und Hexosediphosphorsäure etwa auf ein Drittel herabgesetzt wird.
2. Bei Versuchen mit *Sauerstoff* findet auch bei Gegenwart von gelbem Ferment *keine Abnahme* oder doch keine vermehrte Abnahme der *Milchsäure* statt. Dagegen wird der Sauerstoffverbrauch bei Gegenwart von *Laktazidogen* durch gelbes Ferment etwa *verdoppelt.*

Ob das gelbe Atmungsferment für die Dehydrierung von Laktazidogen und Hexosediphosphorsäure mit Methylenblau als Wasserstoffakzeptor, sowie für den Abbau von Laktazidogen mit Sauerstoff unbedingt notwendig ist, läßt sich durch meine Versuche nicht entscheiden. Die Dehydrasepräparate enthalten nämlich immer noch geringe Menge von gelbem Ferment. Diese Frage ließe sich nur beantworten durch Versuche mit Dehydrasepräparaten, die vollkommen frei von gelbem Ferment sind.

Literaturverzeichnis.

1. Wieland: Über den Verlauf der Oxydationsvorgänge; (1933)/23.
2. Wieland: Wie 1/36.
3. Hahn u. Fischbach: Z. Biol. 95/155 (1934), Tab. 5.
4. Hahn, Niemer u. Freytag: Über den Abbau der Milchsäure durch Hefefermente, Z. Biol. 96 (1935).
5. Hahn, Niemer u. Freytag: Über den Einfluß des gelben Atmungsfermentes auf die Dehydrierung von Laktazidogen und Hexosediphosphorsäure durch Hefedehydrasen; Z. Biol. 96 (1935).
6. Warburg u. Christian: Bioch. Z. 266/379 (1933)
7. Warburg u. Christian: Bioch. Z. 266/380 (1933).
8. Hahn, Fischbach u. Haarmann: Z. Biol. 91/315 (1931).
9. Neuberg: Bioch. Z. 161/241 (1925).
10. Müller: Bioch. Z. 262/239 (1933).
11. Hahn, Fischbach u. Niemer: Z. Biol. 94/58 (1933).
12. Hahn u. Fischbach: Z. Biol. 95/155 (1933).
13. Hahn u. Fischbach: Z. Biol. 95/158 (1933).
14. Bernheim: Biochemie J. 22/1678 (1928).
    Stephenson: Biochemie J. 22/605 (1928).
    Harrison: Biochemie J. 25/1016 (1931).
15. Hahn u. Dürr: Z. Biol. 95/301 (1934).
16. Hahn u. Dürr: Z. Biol. 95/298 (1934).
17. Wieland, Claren u. Pramanik: Ann. 507/203 (1933).
18. Hahn u. Dürr: Z. Biol. 95/305 (1934).
19. Hahn u. Dürr: Z. Biol. 95/306 (1934).
20. Warburg u. Christian: Bioch. Z. 266/377 (1933).
21. Green u. Dixon: Bioch. J. 28/237 (1934).
22. Bertho u. v. Zychlinski: Ann. 512/81 (1934)
23. v. Euler u. Adler: H. S. 226/195 (1934).
24. Wagner, Jauregg, Rauen u. Möller: H. S. 228/275 (1934).
25. Hahn u. Dürr: Z. Biol. 95/298 (1934).
26. Adler u. Michaelis: H. S. 235/154 u. 161 (1935).
27. v. Euler u. Adler: H. S. 226/201 (1934).
28. Hahn u. Dürr: Z. Biol. 95/305 (1934).
29. Hahn u. Haarmann: Z. Biol. 89/159 (1929).
30. Hahn u. Fischbach: Z. Biol. 89/149 (1929).

Lebenslauf.

Am 4. Februar 1909 wurde ich in Arberg als Sohn des Bauers Mathias Freitag und seiner Ehefrau Rosina, geb. Meyer, geboren. Ostern 1930 erhielt ich am hum. Gymnasium in Rosenheim das Reifezeugnis. Ich widmete mich dann an der Unversität in München drei Semester dem Studium der Chemie und hernach dem der Medizin. Oftern 1933 beftand ich die ärztliche Vorprüfung und am 25. Juni 1936 das ärztliche Staatsexamen.

Angenehme Pflicht ift es mir, Herrn Professor Dr. phil. et Dr. med. Amandus Hahn für die Anleitung und Hilfe, die er mir bei der vorliegenden Arbeit zuteil werden ließ, herzlichft zu danken. Ebenso danke ich Herrn Dr. Helmut Niemer für seine kameradschaftliche Unterftützung bei der Ausführung der Versuche.

Ich versichere ehrenwörtlich, vorstehende Arbeit ohne fremde Hilfe gemacht und keine anderen Hilfsmittel, als die im Verzeichnis aufgeführten, benutzt zu haben.

Blasius Freitag.